UNIVERSITÉ DE STRASBOURG FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE SCOLAIRE 1942-1943 N° 327

Contribution à l'Étude du Poison phalloïdien

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 30 juin 1943
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le Grade de Docteur de l'Université
Mention : Pharmacie

par

Henriette DUBAIL
Pharmacien
Assistante à l'Institut d'Embryologie et de Tératologie
de la Faculté de Médecine de Strasbourg

Examinateurs de la Thèse { M. A. GUILLAUME, Professeur, Président.
M. R. SARTORY, Professeur.
Mme S. LALLEMENT, Agrégée. } Juges

Imprimerie Générale
Jean de Bussac
2, Cours Sablon,
Clermont-Ferrand
— 1943 —

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG FACULTÉ DE PHARMACIE

ANNÉE SCOLAIRE 1942-1943 N° 327

Contribution à l'Étude du Poison phalloïdien

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 30 juin 1943
devant la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
pour obtenir le Grade de Docteur de l'Université
Mention : Pharmacie

par

Henriette DUBAIL
Pharmacien
Assistante à l'Institut d'Embryologie et de Tératologie
de la Faculté de Médecine de Strasbourg

Examinateurs de la Thèse : M. A. GUILLAUMÉ, Professeur, Président.
M. R. SARTORY, Professeur. } Juges
Mme S. LALLEMENT, Agrégée. }

Imprimerie Générale
Jean de Bussac
2, Cours Sablon,
Clermont-Ferrand
— 1943 —

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. A. SARTORY, *Doyen*, C. ✻, I. ✪, C. ✠
VOLMAR, *Assesseur*, ✻, I. ✪.
MARANDON, *Secrétaire*, ✻, ⚕, ✠, ✪.

DOYEN HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ✪, ✠.

PROFESSEURS

MM.	A. SARTORY, C. ✻, I. ✪, C. ✠.	Bactériologie.
	N.	Botanique
	VOLMAR, ✻, I. ✪.	Chimie organique.
	GUILLAUME, O. ✻, ⚕, I. ✪, O. ✠	Pharmacie galénique.
	LAPP, I. ✪.	Chimie analytique.
	CORDIER, ✪.	Pharmacie chimique.
	R. SARTORY, ✪, O. ✠	Matière médicale.
	DUQUENOIS.	Toxicologie.

PROFESSEUR HONORAIRE

M. JADIN, O. ✻, I. ✪, ✠.

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM.	A. SARTORY.	Hygiène.
	N.	Hydrologie.
	VOLMAR.	Chimie minérale.
	GUILLAUME.	Zoologie
	LAPP.	Physique
	PRÉLOT.	Législation et Déontologie.
	CORDIER.	Chimie biologique.
	R. SARTORY.	Cryptogamie.
	Mme LALLEMAND, ✪	Pharmacodynamie

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	COLLARD, ✻ ⚕, I. ✪.	Chimie pharmaceutique.
	Mme LALLEMAND, ✪.	Chimie et Physique.
	N.	Histoire naturelle.
	LEDOUX, ⚕	Bactériologie et Parasitologie

A MES PARENTS

A MA FAMILLE

À MON MAITRE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR ANCEL

Professeur à l'Institut d'Embryologie et de Tératologie
à la Faculté de Médecine de Strasbourg
Membre correspondant de l'Institut
et de l'Académie de Médecine
Chevalier de la Légion d'honneur

Respectueux hommage de reconnaissance.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR GUILLAUME

Professeur de Pharmacie Galénique à la Faculté
de Pharmacie de Strasbourg
Officier de la Légion d'honneur

A MES JUGES :

MONSIEUR LE PROFESSEUR R. SARTORY

Professeur de Matière Médicale
à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

MADAME S. LALLEMAND

Agrégée
Chef de Travaux à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
Chargée de cours de pharmacodynamie

A MES MAITRES DE LA FACULTE
DE PHARMACIE DE STRASBOURG

Témoignage de sincère et profonde gratitude.

INTRODUCTION

L'étude du poison phalloïdien a été le but de très nombreux travaux et bien qu'elle remonte aux temps les plus anciens, elle est encore de nos jours l'objet de laborieuses recherches. De plus, elle est complexe. Elle se rattache en effet non seulement à la toxicologie, mais encore à la botanique, à la chimie et à la biologie.

De l'ensemble de cette étude, il ressort actuellement que le champignon Amanita Phalloïdes et sa variété Verna, contenant tous deux le même poison, déterminent chez l'Homme de très graves intoxications à symptômes spécifiques. La puissance toxique du poison, mesurée chez les animaux, a permis l'observation de lésions organiques bien déterminées ; il en est résulté des essais de thérapeutique appropriés dont plusieurs donnent actuellement de bons résultats (organothérapie, sérothérapie).

Du point de vue chimique, le principe actif ne serait ni un alcaloïde, ni un glucoside (Ford), mais un complexe formé d'acides aminés (Wieland et Witkop). D'autre part, il fait partie également du groupe des phytotoxines dont Machebœuf donne la définition suivante : « Les phytotoxines sont des antigènes d'origine végétale présentant des propriétés toxiques vis-à-vis de l'Homme ou des Animaux supérieurs. Elles ont donc la propriété de former des anticorps et de provoquer des phénomènes toxiques ». Des phytotoxines telles que la ricine et l'abrine ont été étudiées par P. Ancel et Mme Lallemand au point de vue de leur action tératogène chez l'embryon de Poulet. Ces deux substances provoquent l'apparition de monstres strophosomes et célosomiens. La question s'est alors posée de savoir si le poison phalloïdien ou phalline avait lui aussi le même pouvoir tératogène que la ricine et l'abrine.

Cette question a fait l'objet d'une partie de ce travail. La première partie de notre exposé comporte un historique dans lequel nous retraçons rapidement tout le développement de l'étude des amanites, envisageant successivement la partie botanique puis la partie chimique et la toxicologie. Cette dernière partie comprend en outre la physiologie pathologique et les thérapeutiques.

Une deuxième partie est consacrée à la recherche de la toxicité du poison chez les Grenouilles et les Poussins, cette toxicité variant suivant la voie d'introduction et suivant les techniques de préparation de l'extrait.

Enfin dans une troisième partie nous avons étudié l'action du poison phalloïdien sur l'embryon de Poulet à différents stades de son développement entre la 48e heure d'incubation et l'éclosion.

Nous tenons, avant de commencer l'exposé de ce travail, à exprimer tous nos remerciements et notre reconnaissance à Monsieur le Professeur Ancel, Directeur de l'Institut d'Embryologie de la Faculté de Médecine de Strasbourg, qui nous a proposé ce travail, prodigué ses conseils éclairés et fait bénéficier de sa grande expérience.

Nous témoignons également nos très vifs remerciements à Monsieur le Professeur Guillaume qui a bien voulu nous faire l'honneur d'accepter la présidence du Jury de notre thèse, à Monsieur le Professeur Sartory et à Madame Lallemand, membres du jury.

Nous sommes particulièrement reconnaissante à Madame Lallemand du grand intérêt qu'elle nous a toujours porté, et de son aide dans l'élaboration de nos travaux.

Nous adressons à Monsieur le Professeur Limousin l'expression de notre vive gratitude pour l'inlassable amabilité avec laquelle il nous a aidée et facilité nos recherches en nous indiquant les rares endroits des environs de Clermont où l'on pouvait récolter amplement les champignons.

Enfin, nous remercions Monsieur le Docteur Vintemberger, chef de Travaux pratiques à l'Institut d'embryologie, des excellents conseils qu'il nous a toujours donnés pendant les trois années que nous avons passées dans son laboratoire et de nous avoir fait largement profiter de son expérience.

PREMIERE PARTIE

HISTORIQUE

Nous diviserons cet exposé en quatre parties : botanique, chimie, toxicologie et thérapeutique.

A. — Botanique.

Nous rappellerons brièvement que les Champignons qui nous intéressent dans ce travail : Amanita phalloïdes et sa variété Amanita verna ont été connus et identifiés dès le début du 18e siècle. C'est Vaillant en 1727 qui leur donna le premier, le nom de Phalloïdes. En 1801, Persoon créa le genre Amanita et vingt ans plus tard Elias Fries plaça cette espèce dans le genre Agaricus. Enfin Quelet en 1872 appela le champignon Amanita Phalloïdes. La variété Verna ou printanière qui ne se différencie de la phalloïde que par sa teinte blanche est confondue dans cet exposé avec Amanita Phalloïdes.

La description et les principaux caractères botaniques de ces champignons ont été amorcés dès les temps les plus anciens. Cependant ce n'est qu'en 1791 que l'on trouve dans l'« Histoire des Champignons de France » de Bulliard un exposé très complet et une figuration soignée de toutes les espèces connues à cette époque. Depuis de très nombreux auteurs ont illustré leurs traités et ouvrages de planches finement dessinées et colorées permettant ainsi une reconnaissance rapide et sûre.

Amanita phalloïdes est un beau champignon blanc verdâtre que l'on trouve en automne sous bois. Il est classé dans l'ordre des basidiomycètes et appartient au groupe des hémiangiocarpes. Il est rangé dans la famille des agaricacées et dans la sous-famille des amanitées. C'est un champignon dont le voile persiste en volve qui demeure visible. Les lames sont blanches et libres. La chair blanche aussi ne change pas de couleur quand elle est lésée. Les spores sont blanches, l'anneau développé et membraneux, l'odeur faible et désagréable.

Amanita Verna ou printanière est une variété blanche d'Amanita Phalloïdes. Elle pousse au printemps également sous bois. Elle a les mêmes caractères et appartient aux mêmes groupes que la précédente. Le chapeau est blanc quand le champignon est jeune, il jaunit en vieillissant. Le pied, la volve et les spores sont blancs.

Ces deux variétés sont également toxiques et généralement mortelles.

B. — Chimie.

L'étude chimique d'Amanita Phalloïdes est relativement récente. Ce n'est qu'au siècle dernier que des travaux importants furent entrepris dans le but d'établir la composition chimique du champignon et la nature de son élément toxique. Avec Braconnot qui, en 1814, commence les recherches par son « Etude sur Agaricus bulbosa », de très nombreux auteurs, tels que Letellier, Boudier, Ore, Kobert, Seibert, Ferry ont cherché à déterminer les principaux constituants du champignon. Ils isolèrent une substance vénéneuse à laquelle ils donnèrent un nom particulier (Amanitine de Letellier, Phalline de Kobert, Phalloïdine de Ore, etc.), et lui attribuèrent la toxicité du champignon sans cependant parvenir à en déterminer la nature.

L'analyse chimique, faite par Boudier, sur ces différents champignons, puis reprise par divers auteurs est encore incomplète. D'après Dujarric de la Rivière, l'Amanite Phalloïde serait constituée de matières organiques et inorganiques. Parmi les matières organiques, de l'eau (90 %) et des sels minéraux (K, Ca, Na). Dans les matières inorganiques se trouve la membrane cellulaire contenant du

mannane et du dextrane et une substance mucilagineuse : la viscosine. D'autre part, on constate la présence de sucres ou hydrates de carbone (glycogène, glucose, tréhalose, saccharose) d'acides citrique et malique, de choline, d'une matière grasse et d'une huile essentielle, de gommes, de tanin, de matières azotées et de diastases. Les matières colorantes n'ont pas été identifiées, ainsi qu'une substance toxique que de nombreux auteurs ont supposé être un alcaloïde.

W.-W. Ford, au cours d'importantes recherches sur cette question, parvint à isoler deux substances :

1° L'une douée d'un pouvoir hémolytique très puissant qu'il appela amanita-hémolysine et qu'il obtint sous forme d'une poudre amorphe de teinte brune après un traitement par l'alcool méthylique du suc d'Amanite et de très nombreuses manipulations chimiques. Ce serait un glucoside contenant un sucre qui, après interversion, réduit la liqueur de Fehling. Il serait composé de carbone, d'hydrogène, d'azote et de soufre dont les proportions ont été déterminées par Abel et Ford. Le pouvoir hémolytique qui a été mesuré sur les globules de nombreux animaux, tels que : Cobaye, Lapin, Poule, Pigeon, Homme, est détruit par la chaleur, les acides et les alcalis. La pepsine, le suc pancréatique et le lait empêchent son action.

2° L'autre ou Amanita-toxine est un principe très toxique dont la nature n'est pas bien précisée. Ce ne serait ni un alcaloïde, ni un glucoside, mais un dérivé indolique composé également de C-H-N-S. Ford l'a obtenu en le précipitant par l'acide phosphotungstique dans l'extrait de champignon préalablement purifié par le nitrate d'argent et l'acétate de plomb. Le précipité est alors décomposé par la baryte et le liquide neutralisé et filtré contient la toxine.

C'est une substance stable qui n'est pas détruite par la chaleur. Cependant les acides l'attaquent à l'ébullition. Elle est soluble dans l'eau, moins dans l'alcool. Ainsi obtenue, elle détermine chez les animaux des symptômes et des lésions caractéristiques.

Plus récemment, F. Lynen et U. Wieland firent paraître dans les « Annalen der Chemie » une communica-

tion sur « les principes vénéneux de l'Amanite phalloïde », suivie deux ans plus tard d'une seconde communication par Wieland et Wilkop sur la constitution chimique de la phalloïdine.

De ces travaux, il ressort que l'Amanite Phalloïde contiendrait quatre poisons de toxicité inégale. Dans la constitution du plus important, la Phalloïdine, entreraient plusieurs acides aminés. Ces auteurs ont procédé à l'extraction des poisons à partir du suc d'Amanite fraîche. La toxicité de la substance obtenue après chaque manipulation fut vérifiée sur la Souris blanche par des injections dans la veine de la queue. Le premier poison ou principe hémolytique est détruit dès le début des opérations par les réactifs chimiques, il l'est également par la chaleur. Il n'a donc aucun rôle dans les intoxications humaines. Les trois autres poisons sont obtenus suivant différentes techniques. Il s'agit de la toxine amanite, de la phalloïdine et d'un troisième poison dénommé poison III. Le point de départ est l'obtention d'une substance dite primaire qui, traitée ensuite par de nombreux réactifs, permet la séparation des poisons. La substance primaire est obtenue en traitant le jus frais de champignon par le sulfate d'ammonium après défécation par l'acétate de plomb. Les flocons obtenus sont purifiés par l'alcool méthylique dans lequel ils sont très solubles. La virulence de cette substance, poudre gris brun, est très grande. Une injection intra-veineuse contenant 30 γ suffit pour tuer une souris en quelques jours. Plusieurs techniques ont été suivies afin d'obtenir la séparation des trois poisons dont l'ensemble forme la substance primaire.

Nous allons décrire rapidement la plus importante aboutissant à l'isolement des trois poisons. Elle consiste à traiter en premier lieu, par l'alcool butylique, la substance primaire jusqu'à dissolution complète. On filtre ensuite sur une colonne d'hydroxyde d'aluminium qui absorbe les poisons. Les élutions sont alors faites en quatre fois : les deux premières avec l'alcool absolu puis les deux suivantes avec un mélange d'alcool méthylique et d'eau. Après évaporation de l'alcool absolu des premières élutions, on obtient une poudre brune contenant le poison II. L'évaporation du mélange alcool méthylique et eau des troisième

et quatrième élutions donne une poudre jaune foncé contenant le poison I.

Ces poudres sont purifiées ensuite dans un mélange à parties égales d'alcool butylique et de chloroforme après avoir été reprises par l'eau. Le poison I se dissout dans l'eau et après plusieurs agitations dans le mélange alcoolique reste dans la solution aqueuse que l'on évapore ensuite. Le poison II ne se dissout pas dans l'eau, mais dans le mélange alcool-chloroforme, d'où on l'isole par évaporation. Le résidu aqueux contient le poison III. Ce troisième poison a été caractérisé, mais son isolement n'a pas été achevé.

Ces trois poisons diffèrent les uns des autres par leur virulence et par les réactions chimiques qui sont particulières à chacun.

Le poison I est la toxine amanite ; son action est lente. La dose léthale est de 15 γ (dose limite qui agit mortellement sur une Souris de 16 à 20 grammes). Elle est soluble dans l'eau, dans l'alcool méthylique, très peu soluble au contraire dans l'alcool éthylique et dans l'alcool buthylique pur, et insoluble dans le chloroforme, l'éther et l'acétone. Elle précipe par l'acétate mercurique et par l'acide phosphorique.

La phalloïdine ou poison II est obtenue à l'état pur cristallisé. Elle est insoluble dans l'eau froide, plus soluble à chaud. Elle agit très vite. En effet en injection intraveineuse à la dose de 50 γ, elle donne la mort en 5 à 6 heures. Contrairement à la toxine amanite, elle est plus soluble dans l'alcool butylique que dans l'eau et très soluble dans les alcools éthylique, butylique, méthylique et dans la pyridine. Elle précipite par l'acide phosphotungstique. Ces différences de solubilité avec le poison II permettent leur séparation.

Enfin le dernier poison obtenu ou poison III agit lentement à la dose de 20 γ. Il est précipité en milieu alcoolique par l'acide chloroplatinique contrairement à la toxine amanite et à la phalloïdine.

Les auteurs concluent à une analogie entre ces substances qui ont les réactions des acides aminés et les poisons des blancs d'œufs qui se composent surtout d'acides aminés.

Ces travaux ont été continués par Wieland et Witkop. Ils ont déterminé à la suite de très importantes recherches les principaux constituants de la phalloïdine. Par dissociation de cette substance, 4 acides aminés ont été découverts, ce sont : l'oxytryptophane, la cystine, l'oxyproline b et l'alanine.

La cystine est obtenue au cours de l'hydrolyse sulfurique de la phalloïdine. Elle se sépare en flocons colorés qui, purifiés par l'ammoniaque, cristallisent en plaquettes hexagonales blanches.

Dans le filtrat, que l'on traite par l'alcool butylique, on obtient par évaporation l'oxytryptophane. Purifié, il cristallise en forme de pierre à aiguiser incolore.

Les deux autres acides aminés l'oxyproline et l'alanine sont dans le résidu cristallisé obtenu par évaporation de l'alcool butylique. L'oxyproline b est séparée par le sel de Reinecke. L'alanine est dans le filtrat. On l'obtient pure par des cristallisations successives dans l'alcool à 70°.

La toxicité de la phalloïdine ne réside pas dans les acides aminés, mais dans les peptides. En effet, l'oxytryptophane n'est pas toxique.

C. — Toxicologie.

Les travaux sur les champignons et en particulier sur les Amanites, s'étaient, jusqu'au siècle dernier, uniquement limités aux recherches botaniques et chimiques.

Les physiologues constataient seulement le terrible effet du poison dans les cas d'intoxication chez l'Homme. L'expérimentation sur les Animaux ne commença que beaucoup plus tard avec Boudier, Kobert, Ford, Ferry et fut utilisée récemment par de très nombreux auteurs tels que Sartory et Maire, Dujarric de la Rivière, Limousin, Guétrot et Meitès, au cours de leurs recherches.

Rappelons d'abord brièvement les symptômes et les lésions observés au cours de l'intoxication chez l'homme. Il se dégage des multiples observations faites chez les sujets intoxiqués un ensemble de symptômes très caractéristiques de l'intoxication phalloïdienne et qui lui sont très particuliers.

Le premier caractère est le temps long qui s'écoule entre l'absorption des champignons et l'apparition des premiers symptômes (10 à 12 heures en moyenne). Ce n'est qu'après ce délai que surviennent les troubles digestifs : diarrhée, vomissements, soif ardente, accompagnés de violentes douleurs intestinales ; ensuite se manifestent des troubles nerveux : état de prostration complète contrastant avec la conservation parfaite de l'intelligence. Le pouls s'accélère et s'affaiblit. La température baisse. On observe également de l'ictère, de l'anurie, et dans certains cas un refroidissement des extrémités avec cyanose. La mort peut survenir très rapidement par collapsus cardiaque, ou au contraire, plusieurs jours et même plusieurs semaines après le début de l'intoxication.

Les organes lésés sont surtout ceux du tube digestif. Ils sont en général fortement congestionnés. Le foie et les reins sont dans un état de dégénérescence graisseuse avancée. Leurs cellules sont souvent fortement nécrosées. De nombreux auteurs ont également trouvé des lésions au cœur, aux poumons et dans le tissu nerveux.

Les recherches poursuivies sur les animaux dans le but soit d'étudier la toxicité du poison, soit d'établir une thérapeutique ont été faites par divers auteurs.

Ford expérimente sur les Cobayes la toxicité d'extrait d'Amanite, qu'il injecte sous la peau à des doses variables amenant la mort entre 24 heures et 5 jours. Les lésions observées portent sur tous les organes et en particulier sur le foie et le rein : congestion avec hémorragie et dégénérescence graisseuse avec désagrégation des cellules. Il note aussi une destruction assez importante des globules sanguins qu'il attribue à l'introduction par la voie sous-cutanée d'extraits de champignons crus. Cette destruction n'existe pas chez l'Homme qui ingère les champignons cuits. Le poison est dans ce cas modifié par l'action des sucs digestifs et par la chaleur de la cuisson.

Dujarric de la Rivière a fait de très importantes recherches sur les animaux à partir d'un extrait glycériné d'Amanites phalloïdes. Cet extrait ou toxine est préparé de la façon suivante : Des chapeaux d'Amanites fraîchement cueillies sont triturés dans un mortier stérilisé en présence de sable fin stérile et d'un mélange stérile éga-

lement composé d'une partie de glycérine et de 2 parties d'eau (2 parties du mélange pour 1 de champignons). Après macération de 2 heures, le tout est pressé puis filtré sur bougie Chamberland. Le liquide obtenu est brun, visqueux et stérile. Il constitue la toxine.

Cette toxine glycérinée inoculée au Lapin par voie intrapéritonéale le tue rapidement. Les symptômes de l'intoxication sont très caractéristiques : paralysie des membres postérieurs, congestion vasculaire des oreilles, agitation extrême, secousses cloniques violentes suivies d'abattement. La paralysie augmente et l'animal meurt en contracture. Chez la Souris blanche inoculée également par la même voie, les symptômes sont sensiblement les mêmes : paralysie du train postérieur et agitation clonique si forte que « l'animal saute comme mû par un ressort qui se détendrait brusquement ». Les Singes sont tués également par des injections intrapéritonéales. Les Moutons qui n'ont manifesté aucun malaise lorsqu'ils ont absorbé la toxine par voie buccale, meurent rapidement quand elle est injectée par voie sous-cutanée ou intra-péritonéale ou encore intra-veineuse. Le Cobaye manifeste des troubles nerveux à allure tétanique lorsqu'il est inoculé. Le pincement de la patte ou de l'oreille détermine ces réactions nerveuses.

La Grenouille est tuée également très rapidement par injection intra-péritonéale. L'inoculation dans les muscles de la patte donne des symptômes très nets. Après 15 minutes, on observe des contractions violentes commençant par les membres inférieurs, puis une agitation extrême de tout le corps se manifestant par des bonds désordonnés interrompus par des instants de repos. Après quelque temps apparaît une abondante secrétion de mucus suivie de dyspnée et l'animal meurt en contracture.

Dujarric de la Rivière termine par des expériences sur les Poissons. Ceux-ci, maintenus dans un liquide, contenant la toxine, manifestent une agitation très grande avec des mouvements convulsifs interrompus par des périodes de calme. Ils meurent rapidement en 4 ou 5 heures.

Il ressort donc de toutes ces expériences que les symptômes de l'intoxication, obtenue par injection de l'extrait

glycériné, sont caractérisés par une très violente secousse nerveuse suivie d'une mort rapide.

Les lésions furent observées chez les Lapins, Cobayes, Chèvres et Moutons traités. Le foie et le rein furent particulièrement examinés chez la Chèvre et le Mouton.

Le foie est fortement congestionné et les cellules hypertrophiées sont profondément lésées : protoplasme granuleux, vacuolé et noyaux détruits en partie. Les tubes urinaires sont dégénérés avec des débris de cellules dans la lumière des tubes et la zone corticale est fortement congestionnée. Le système nerveux chez le Lapin est fortement congestionné au niveau des vaisseaux méningés sans toutefois avoir d'altérations des cellules nerveuses. Chez le Cobaye, en plus de l'état congestif, il a été trouvé des altérations de la cellule nerveuse au niveau de la moelle.

Le Professeur H. Limousin au cours de ses travaux sur les Amanites expérimente sur le Chat et le Lapin la toxicité du champignon cru et cuit administré par ingestion afin de comparer les accidents survenus chez l'animal et chez l'homme.

Un Lapin et un Chat reçoivent respectivement à l'aide de la sonde gastrique 10 à 20 grammes d'Amanite phalloïde chauffée à 100-120°. Le Lapin ne manifeste aucun trouble avec cette dose. Le Chat au contraire meurt en 48 heures avec une dose de 10 grammes de champignons, en présentant des troubles gastriques et nerveux. L'examen des organes est fait aussitôt après la mort. Le foie et le rein sont fortement lésés. Si l'on opère par injection le Lapin meurt avec des lésions hépatiques quand il reçoit un demi centimètre cube de jus de champignons chauffé à 100°. Par contre, le jus frais ne le tue pas même à la dose de 1 centimètre cube.

Il résulte de ces expériences tout d'abord que le Lapin a la propriété de neutraliser naturellement le poison. Cette propriété réside dans l'estomac et les centres nerveux en particulier le cerveau. En effet, un Chat absorbant une dose mortelle de champignons cuits, soit 50 grammes mélangés avec 2 estomacs et 7 cervelles crus de Lapins ne meurt pas. Si le mélange ne contient pas de cervelles, le Chat meurt au bout de 6 à 7 jours en manifestant uni-

quement des troubles nerveux. En effet, l'examen du foie et du rein, après la mort, ne révèle aucune nécrose cellulaire.

L'estomac a donc neutralisé une toxine à électivité hépatique. Une autre toxine agissant sur le système nerveux serait seule cause de la mort de l'animal. Cette toxine est donc la toxine neutralisée par le cerveau du Lapin.

L'auteur conclut que ce champignon contient 2 toxines : une hépato-toxine et une neuro-toxine. L'hépato-toxine n'existe pas ou en très faible quantité dans le champignon très frais. Elle est démasquée ou produite par la chaleur. Seule la neuro-toxine existe avec la même activité dans le frais et le cuit.

Enfin Vogt dans ses recherches sur les effets physiologiques de la phalloïdine, isolée par Wieland, expérimente sur les Souris la toxicité de cette substance et étudie les lésions hépatiques formées.

La dose toxique, en injections intra-musculaires, est de 6,6 γ par gramme de souris et donne la mort en 24 heures. Les symptômes de l'intoxication sont caractérisés par une immobilité et une asthénie grandissantes avec abaissement de la température et accélération de la respiration.

Le foie est l'organe le plus touché. La lésion typique observée est la dégénérescence graisseuse des cellules. Cette lésion est plus ou moins importante car elle dépend de la durée de l'intoxication. Lorsque celle-ci est très rapide, le foie ne présente aucune trace de dégénérescence graisseuse, de même lorsqu'elle est très lente. Elle apparaît, pour une dose moyenne de 5 γ par gramme de souris, 48 heures après le début de l'intoxication. L'examen microscopique du foie décèle de fines gouttelettes de graisse réparties dans tout le tissu. On observe également dans les cellules de nombreuses cavités entourées d'une auréole colorée en rouge par l'éosine et non colorée par le soudan. Ces cavités ne sont pas de nature lipoïdique et n'existent que chez les animaux sacrifiés au cours de l'intoxication. On ne les trouve pas chez ceux qui ont succombé. Lorsque l'intoxication est très lente le foie mon-

tre de nombreuses cellules en mitose. Ces divisions indiquent une régénération en vue d'une guérison.

L'auteur conclut que la phalloïdine est un poison du foie produisant des cavités dans les cellules du centre des lobes et une forte dégénérescence graisseuse.

D. Thérapeutique.

Les traitements rationnels appliqués généralement dans les empoisonnements fongiques ne donnent ici aucun résultat. Différentes méthodes ont été utilisées pour lutter contre l'intoxication phalloïdienne. Nous rappellerons les principales.

a) *Organothérapie.* — Limousin, s'appuyant sur les résultats de ses expériences chez les animaux, fait absorber aux malades un mélange finement haché de 7 cervelles et 3 estomacs de lapin, non lavés. Ce mélange peut être rendu plus appétissant en enrobant chaque bouchée d'un peu de sucre ou de confiture. Les troubles de l'intoxication s'arrêtent en général une heure après l'absorption. Si ceux-ci persistent, on renouvelle la médication autant de fois qu'il est nécessaire jusqu'à cessation complète des symptômes.

b) *Sérothérapie.* — Des résultats positifs ont été obtenus avec une technique instituée par Dujarric de la Rivière basée sur les propriétés antigéniques de la toxine phalloïdienne. L'immunisation du Cheval a été réalisée par cet auteur au moyen d'extraits phalloïdiens. La toxine glycérinée s'étant montrée trop toxique, on utilisa un extrait huileux dans lequel la glycérine est remplacée par de l'huile d'olives. L'immunisation obtenue par des injections répétées n'étant pas d'assez longue durée, elle est faite actuellement avec « un extrait aqueux non glycériné mais formolé au moment de la préparation ». Le sérum obtenu se montra préventif chez la Souris. Il est actuellement utilisé dans les intoxications humaines comme curatif à la dose de 40 cm^3 par jour.

c) *Autres procédés.* — Binet et Marek ont remarqué que l'intoxication expérimentale détermine chez les animaux une forte hypoglycémie pouvant entraîner la mort. Afin de ramener à un taux normal le sucre dans le sang,

ces auteurs ont préconisé des injections intraveineuses de sérum glucosé isotonique au cours de la maladie. Des résultats positifs ont été obtenus chez le Lapin. Cette thérapeutique n'a cependant pas encore été appliquée à l'Homme.

Une autre méthode, basée également sur les troubles sanguins, et instituée par Guétrot et Meitès, consiste à faire absorber aux intoxiqués de l'eau fortement salée (une cuillerée à café de sel de cuisine par verre d'eau froide), dans le but d'une « rechloruration » de l'organisme. L'expérimentation a donné de bons résultats.

DEUXIEME PARTIE

RECHERCHES PERSONNELLES SUR LA TOXICITÉ DU POISON PHALLOIDIEN CHEZ DES ANIMAUX HOMÉOTHERMES ET POIKILOTHERMES

Nous avons étudié la toxicité du poison phalloïdien chez la Grenouille et le Poussin. Nous examinerons successivement les différentes techniques de préparation de l'extrait, les effets du poison chez les grenouilles et les poussins, les lésions organiques observées macroscopiquement et microscopiquement ainsi que l'action hémolytique de la toxine phalloïdienne.

CHAPITRE Ier

LES DIFFÉRENTES TECHNIQUES DE PRÉPARATION DES EXTRAITS

Nous avons récolté les champignons aux environs de Clermont, les Amanites verna ont été cueillies au mois de juin, tandis que les phalloïdes l'ont été au mois de septembre. Ces champignons ont été utilisés au fur et à mesure de la récolte ou mis à sécher suivant les besoins.

Le séchage a été fait à l'air libre et le plus rapidement possible afin d'éviter toute putréfaction.

Nous avons utilisé également des champignons conservés en tubes scellés et passés à l'autoclave pendant 10 minutes que M. le Professeur Limousin a eu la grande amabilité de mettre à notre disposition.

C'est à partir de ces différentes préparations qui sont toutes trois également toxiques que nous avons préparé les extraits.

A. — Techniques de préparation du poison.

Les champignons frais sont triturés dans un mortier avec du sable fin puis pressés. Le liquide obtenu est filtré à plusieurs reprises sur papier. L'extrait est limpide, de couleur brun clair, d'odeur forte et désagréable, acide au tournesol.

Les champignons secs sont gardés dans un endroit

fermé et sec. Au moment de l'emploi, on les fait séjourner 12 à 15 heures dans 10 fois leur poids d'eau, à la glacière. Puis on les triture au mortier comme précédemment.

Les extraits obtenus ont été administrés aux animaux soit à l'état frais, c'est-à-dire provenant de champignons frais ou secs mais n'ayant pas été chauffés, soit après chauffage. Dans ce cas, l'extrait frais est porté à l'ébullition pendant une à deux minutes en évitant toute évaporation. Il se forme un précipité de matières albumineuses. On filtre. On obtient l'extrait chauffé à réaction acide au tournesol.

Ces extraits se conservent mal. On peut cependant les utiliser 2 à 3 jours après la préparation sans que leurs propriétés aient changé mais en les maintenant à une température voisine de zéro. De plus, ils contiennent beaucoup d'impuretés. Une purification chimique s'imposait. Elle a été faite suivant la méthode de Lynen et Wieland.

Purification chimique. Les Amanites phalloïdes sont récoltées en grande quantité et aussitôt pressées à plusieurs reprises. Les tourteaux sont repris par l'alcool méthylique et pressés de nouveau. Tous les liquides obtenus sont mélangés. On neutralise par la soude et on défèque au sous-acétate de plomb. Après un long repos, on décante puis on contrifuge plusieurs fois en lavant à l'eau le précipité. On réunit toutes les eaux de lavage. On acidifie ensuite légèrement pour précipiter l'excès de plomb et après concentration par évaporation, on filtre. Dans ce filtrat, on précipite alors par le sulfate d'ammonium une substance qui contient les toxines du champignon. On lave les flocons obtenus avec une solution saturée de sulfate d'ammonium et on sèche par le vide. Il ne reste plus qu'à séparer le cristaux de sulfate d'ammonium de la substance en broyant le tout dans l'alcool méthylique que l'on décante et évapore. On obtient une substance brune très hygroscopique et toxique.

Technique de Dujarric de la Rivière. Nous avons également utilisé une troisième technique, celle de la préparation de la toxine glycérinée de Dujarric de la Rivière. Nous l'avons employée uniquement pour étudier le rôle que joue la glycérine dans les symptômes de l'in-

toxication. Cette technique a été exposée à la première partie de ce travail. Nous n'y reviendrons pas ici.

B. — Techniques d'administration du poison aux animaux.

C'est par inoculation ou absorption que les expériences ont été faites chez les poussins et les grenouilles.

L'inoculation consiste à injecter sous la peau du dos une certaine quantité de liquide. On opère sur des poussins âgés de 4 à 5 jours.

Chez les grenouilles, l'injection est faite dans les sacs lymphatiques dorsaux. On maintient les animaux immobiles pendant une minute ou deux après l'opération afin de mieux favoriser la pénétration du liquide.

L'absorption buccale est beaucoup plus délicate surtout chez les poussins. En effet pour cette opération, on maintient le bec ouvert avec une pince et on y laisse tomber goutte à goutte très lentement à l'aide d'une pipette la quantité d'extrait voulue. On risque en allant trop vite d'amener la mort de l'animal en quelques minutes.

Chez la Grenouille, l'ingestion est faite à l'aide d'un petit tube de caoutchouc introduit par la bouche jusque dans l'estomac.

CHAPITRE II.

SYMPTOMES ET ÉVOLUTION DE L'INTOXICATION PHALLOIDIENNE

Nous décrirons successivement les symptômes observés chez la Grenouille et le Poussin.

A. — Symptomes chez la grenouille.

Comme nous l'avons dit précédemment, la toxicité du poison peut varier suivant la voie d'inoculation et suivant la préparation de l'extrait. Nous avons donc expérimenté sur les grenouilles successivement l'injection sous-cutanée et l'absorption buccale de l'extrait frais puis de l'extrait chauffé.

a) *Injection d'extrait frais.*

Dix grenouilles reçoivent en injection sous-cutanée 48 milligrammes de substance (soit un centimètre cube d'extrait). Les symptômes de l'intoxication apparaissent environ un quart d'heure après l'injection. On observe en premier lieu une forte décoloration de la peau, puis une accélération croissante de la respiration, du myosis et une abondante sécrétion de spume. L'animal reste prostré dans un coin du bocal, ne manifestant aucune réaction nerveuse au contact d'un agitateur. Peu de temps avant la mort, c'est-à-dire une heure trente environ après l'injection, les grenouilles replient avec peine leurs membres

lorsqu'on les déplace, et se retournent avec de grandes difficultés lorsqu'elles sont placées sur le dos. La respiration s'est ralentie au point de paraître nulle, le cœur battant toujours. Les membres postérieurs sont en extension, tandis que les antérieurs restent repliés sur la poitrine. Elles meurent en général deux heures après l'injection. Lorsque la dose est moins forte, la mort survient beaucoup moins rapidement et peut être même retardée de 5 à 8 jours quand la dose injectée est de 4 milligrammes.

b) *Injection d'extrait chauffé.*

Lorsqu'on inocule un extrait d'amanite ayant été préalablement porté à l'ébullition, la dose de 44 mgr n'est toxique que pour les deux tiers des animaux traités. La mort survient dans les dix jours qui suivent. On a observé chez la moitié de ces grenouilles la formation de petites lésions épidermiques 3 à 4 jours après l'inoculation. Elles se présentent sous forme de petites ulcérations sanguinolentes de quelques millimètres carrés de surface à l'extrémité des pattes, sous les cuisses et au nez. Les symptômes de l'intoxication apparaissent 24 heures seulement avant la mort. A ce moment, la peau se décolore, l'animal secrète beaucoup de spume, il reste prostré et meurt sans avoir sensiblement changé de place.

De nombreux témoins recevant un centimètre cube d'eau distillée sont mis dans les mêmes conditions d'expérience et observés. Aucun d'eux ne manifeste de troubles ni ne succombe.

L'extrait chauffé à l'ébullition a perdu de sa toxicité. Celle-ci en effet est beaucoup moins violente que celle de l'extrait frais et donne la mort en un temps beaucoup plus long.

c) *Injection d'extrait glycériné.*

Nous avons été amenée à injecter aux grenouilles la toxine glycérinée selon la technique de Dujarric de la Rivière, car il nous a semblé que les symptômes de l'intoxication phalloïdienne décrits par cet auteur chez la Grenouille ne correspondaient pas à ceux que nous avons observés chez cet animal lorsqu'il reçoit l'extrait aqueux préparé selon notre technique.

Nous allons rapporter les symptômes observés par Dujarric de la Rivière lorsqu'il injecte à une grenouille, un centimètre cube de toxine glycérinée, et décrire ceux que nous avons obtenus avec cette toxine préparée par nous-même suivant la technique de cet auteur. Nous comparerons ensuite ces résultats avec ceux que l'on obtient lorsqu'on injecte la glycérine seule d'une part et l'extrait phalloïdien seul d'autre part, sachant que la proportion de la glycérine dans l'extrait phalloïdien glycériné de Dujarric est la suivante :

Glycérine	26,5
Extrait d'amanite	23
Eau	50,5

1° Symptômes décrits par Dujarric de la Rivière chez la Grenouille inoculée avec un centimètre cube de toxine glycérinée.

L'inoculation est faite dans les muscles de la patte. Les troubles commencent 15 minutes environ après. La grenouille est saisie de contractures violentes dans les membres inférieurs, puis dans les membres supérieurs. Elle s'agite, « se renverse sur elle-même, saute d'une façon désordonnée, souvent hors du bocal. Ces périodes d'agitation et de contracture sont interrompues à certains moments par des périodes de repos. Vers la fin, il y a dyspnée, une sécrétion très abondante de mucus et de spume et l'animal meurt en contracture avec extension des membres ».

2° Symptômes observés par nous-même chez la grenouille injectée avec la toxine glycérinée préparée selon la technique de Dujarric de la Rivière.

Nous avons préparé l'extrait phalloïdien à partir de chapeaux d'Amanites fraîches auxquels nous avons ajouté le mélange eau-glycérine, dans les proportions indiquées par l'auteur. Deux grenouilles reçoivent un centimètre cube de la préparation. Aussitôt après, nous avons noté les symptômes suivants : les grenouilles s'agitent et l'eau devient écumeuse, puis 15 à 20 minutes après, les membres postérieurs sont agités de tremblements et se raidissent. Ces phénomènes s'étendent ensuite aux mem-

bres antérieurs et gagnent tout le corps. L'animal est alors fortement agité, se renversant sur le dos et présentant des crises nerveuses rappelant celles du tétanos. Les crises sont interrompues par des détentes passagères. La respiration qui était devenue très rapide s'est beaucoup ralentie. Après trois quarts d'heure environ l'excitation nerveuse s'affaiblit et l'animal reste prostré. Les membres antérieurs sont croisés sur la poitrine, les postérieurs étant en extension. Les yeux sont fermés et l'animal meurt deux heures trente environ après l'injection.

Ces symptômes diffèrent beaucoup de ceux que nous avons observés précédemment et décrits au paragraphe 3 chez les grenouilles injectées avec l'extrait frais aqueux. Mais la dose du poison injectée dans ce cas étant beaucoup plus forte que celle inoculée avec la toxine glycérinée, nous avons refait cette expérience avec l'extrait phalloïdien dilué dans l'eau, dans la même proportion que la toxine glycérinée, c'est-à-dire en faisant un mélange d'extrait et d'eau dans la proportion de 23 % d'extrait.

Deux grenouilles reçoivent un centimètre cube de cette préparation et sont mises en observation. Les symptômes débutent 15 minutes après et se résument ainsi : décoloration de la peau, myosis, secrétion de spume et prostration. La mort ne survient que 5 à 6 heures après l'inoculation.

3° Ces symptômes étant très différents de ceux de l'intoxication obtenue avec l'extrait glycériné à la même dose d'extrait d'amanite, nous avons injecté alors un mélange de glycérine et d'eau contenant 26,5 % de glycérine afin de bien déterminer le rôle de la glycérine.

Trois grenouilles reçoivent un centimètre cube du mélange. Les symptômes dus à cette injection commencent au bout de 15 minutes. Les animaux s'agitent et sautent dans les bocaux. Des tremblements surviennent ensuite dans les membres suivis rapidement de contractures. Les grenouilles toutes raidies sont alors secouées de crises nerveuses à allure tétanique, déclanchées soit par un choc soit par le toucher. Elles se renversent et restent sur le dos. La respiration très ralentie, paraît arrêtée. L'animal

est aussi rigide qu'un morceau de bois. Cet état dure une minute environ et une détente relative se produit, puis de nouveau les crises recommencent. Ces troubles diminuent d'intensité et se calment au bout de trois quarts d'heure, puis les grenouilles reprennent peu à peu leur aspect normal.

De cette expérience, on peut conclure que l'inoculation de glycérine est la cause de troubles nerveux très caractéristiques. Ces troubles ont une durée variable suivant la valeur de la dose injectée. De nouvelles expériences nous ont en effet donné les résultats suivants :

Pour un mélange eau-glycérine contenant 50 % de glycérine, la durée des symptômes est de deux heures. Lorsque la proportion n'est que de 10 %, les troubles cessent au bout de 20 minutes et quand elle est de 3 % aucune réaction nerveuse n'est observée.

Il résulte de ces expériences que les symptômes de l'intoxication par la toxine glycérinée sont à la fois dus à la glycérine et à l'extrait fongique. Ils se superposent et réalisent un syndrome qui n'est plus du tout caractéristique de l'intoxication phalloïdienne. Les crises nerveuses à allure tétanique ne sont pas déterminées par le poison phalloïdien, mais par la glycérine.

Le mode d'introduction du poison pouvant modifier ses effets toxiques, nous l'avons administré par voie buccale. Nous examinerons successivement l'action de l'extrait frais et de l'extrait chauffé.

d) *Ingestion d'extrait frais.*

Cinq grenouilles furent mises en expérience. Des témoins reçurent la même quantité d'eau. La dose absorbée a été de 48 milligrammes. Les symptômes observés aussitôt après l'absorption ont été peu importants : la peau s'est décolorée pendant une heure environ, puis a repris sa teinte normale. On a noté également une faible sécrétion de spume. Ce n'est que le vingtième jour après l'absorption que la mort est survenue avec les symptômes habituels. On a observé également chez 4 de ces grenouilles les mêmes petites ulcérations épidermiques décrites précédemment dans les intoxications par injection d'extrait chauffé.

c) *Ingestion d'extrait chauffé.*

Le même extrait porté à l'ébullition puis filtré a été administré à 6 grenouilles par voie buccale à la dose de 44 mgr. Les animaux ne manifestèrent aucun symptôme d'intoxication pendant toute la durée de l'observation qui fut de cinq semaines.

A cette dose l'extrait fongique chauffé n'a donc plus aucune action toxique chez la Grenouille.

B. — Symptomes chez le poussin.

Ces animaux se sont montrés plus sensibles que les grenouilles, les doses administrées, quoique plus faibles, ont donné des intoxications à la fois plus violentes et plus caractéristiques.

a. *Injection d'extrait frais.*

En injection sous-cutanée, 24 milligrammes de substance à l'état frais tuent le poussin âgé de 4 à 5 jours en moins de vingt-quatre heures avec les symptômes et les lésions spécifiques du poison phalloïdien.

C'est environ 15 à 20 minutes après l'injection qu'apparaissent les premiers troubles. L'animal se retire à l'écart, il est somnolent et triste. Cet état s'accentue pendant une heure environ ; les ailes sont pendantes, la tête tombe en avant et la respiration s'accélère. L'animal manifeste souvent une soif ardente. La respiration devient de plus en plus difficile et l'oblige à ouvrir le bec à chaque inspiration. Il tombe et se débat en poussant quelques petits cris. Il meurt la tête renversée en arrière et les pattes en extension. Dans quelques cas, l'animal très prostré s'endort et meurt sans se déplacer. En moyenne, la mort survient entre cinq et douze heures après l'injection, certains sujets offrant une résistance individuelle plus grande que d'autres.

La plus forte dose qui ait été injectée est de 48 mgr. Elle donne la mort en 4 heures. Il n'a pas été possible d'obtenir la mort dans un délai plus court. Par contre avec des doses décroissantes allant de 24 mgr à 2 mgr, l'intoxication a été beaucoup moins rapide et ne s'est produite qu'au troisième jour. A ce moment, les symptômes se sont manifestés par de la somnolence, de l'inap-

petance, et de la dyspnée. La mort est survenue au bout de 5 à 6 heures. Avec une dose de 1 mgr, 2, la toxicité est nulle.

b) *Injection d'extrait chauffé.*

L'extrait chauffé donne exactement les mêmes symptômes d'empoisonnement que l'extrait frais. La toxicité a cependant diminué d'intensité puisqu'une dose de 22 mgr est léthale au bout de 1 à 3 jours seulement et que la dose de 2 mgr n'est plus toxique.

c) *Injection d'extrait purifié.*

Contrairement à l'extrait chauffé, l'extrait purifié s'est révélé beaucoup plus toxique. La dose de 4 mgr. injectée sous la peau de 2 poussins les tue en moins de 24 heures. 2 milligr. donnent la mort en 30 heures et 1 mgr en 48 heures. Les symptômes de l'intoxication sont toujours les mêmes que ceux décrits précédemment.

d) *Ingestion d'extrait frais.*

Administré par ingestion, l'extrait frais est un peu moins toxique qu'en injection sous-cutanée. A la dose de 24 mgr. il tue les poussins en 48 heures. Les symptômes n'apparaissent que 2 à 3 heures avant la mort. Ils sont caractérisés par de la somnolence et de la dyspnée. L'animal se débat pendant 15 à 30 minutes, puis meurt. A des doses moins fortes, la mort survient moins rapidement : 16 mgr. tuent seulement en 3 jours et 7 mgr en 4 jours.

e) *Ingestion d'extrait chauffé.*

L'extrait chauffé donne les mêmes symptômes que l'extrait frais, mais la toxicité a sensiblement diminué. La dose de 24 mgr ne tue qu'au bout de 3 jours, tandis que celle de 7 mgr n'a plus d'action toxique.

Les symptômes de l'intoxication ne dépendent ni de la préparation de l'extrait ni de la dose inoculée ni du point d'inoculation. Ils surviennent en général 2 à 3 heures avant la mort et sont caractéristiques de l'intoxication phalloïdienne.

C. — Toxicité comparée du poisson phalloïdien chez la grenouille et le poussin.

Dans une même espèce, la toxicité varie suivant le mode d'introduction du poison. Chez la Grenouille, l'extrait frais en injection tue les animaux en 2 heures à la dose de 48 mgr. et en 3 à 4 jours à la dose de 4 mgr., tandis que par ingestion, la dose de 48 mgr. ne tue qu'à 20 jours et que la dose de 22 mgr. n'est pas mortelle.

Chez le Poussin, l'extrait frais en injection à la dose de 24 mgr amène la mort en 24 heures, celle de 2 mgr l'amène en 3 à 4 jours ; par ingestion, la dose de 24 mgr donne la mort en 2 à 3 jours seulement et celle de 7 mgr. en 4 jours, la dose de 2 mgr n'est plus mortelle.

Le chauffage de l'extrait modifie aussi la toxicité. Chez la Grenouille, la dose de 44 mgr d'extrait chauffé en injection tue en moyenne au sixième jour. La même dose en ingestion n'est pas toxique.

Chez le Poussin, la dose de 22 mgr. d'extrait chauffé tue en 1 à 3 jours tous les animaux après injection, tandis que la dose de 4 mgr n'en tue plus que quelques-uns et la dose de 2 mgr. n'est plus toxique. Par ingestion, la dose de 22 mgr. tue tous les animaux en moins de 3 jours et les doses inférieures à 15 mgr ne sont plus toxiques.

L'extrait purifié n'a été expérimenté que chez le Poussin en injections ; 4 mgr ont donné la mort en moins de 24 heures, 2 mgr l'ont amenée en 30 heures et 1 mgr en 48 heures.

CHAPITRE III.

LES LÉSIONS DÉTERMINÉES PAR LE POISON PHALLOIDIEN

Les principaux organes touchés au cours de l'empoisonnement sont le foie et les reins. L'estomac, l'intestin, le pancréas, le cœur et les poumons examinés macroscopiquement aussitôt après la mort et microscopiquement après fixation et coloration n'ont présenté aucune particularité. Nous allons étudier successivement chez la Grenouille, puis chez le Poussin, le foie et le rein prélevés aussitôt après la mort.

A. — Lésions chez la grenouille.

Les différentes voies d'introduction du poison chez la Grenouille, ainsi que les différentes doses administrées modifient sensiblement les lésions organiques.

Lorsque la mort survient deux heures après l'injection sous-cutanée de 48 mgr de substance, les organes examinés aussitôt ne présentent aucune anomalie visible. Le cœur est en diastole chez tous les sujets. Une dose réduite de moitié donne la mort dans un temps beaucoup plus long et lèse davantage les organes. A l'autopsie, dans ce cas, on constate des taches brunâtres très apparentes sur le foie, et une congestion intense des reins avec dilatation des vaisseaux sanguins. Lorsque l'intoxication est causée par des injections d'extrait chauffé ou par absorption buccale d'extrait frais, on note, en plus des

lésions précitées, les petites ulcérations épidermiques constatées au chapitre précédent. Ces petites ulcérations examinées au microscope montrent des bords renflés et un fond contenant une importante quantité de globules sanguins : hématies et leucocytes. Tout le tissu conjonctif voisin renferme aussi de nombreux leucocytes.

L'examen histologique des foies des grenouilles a été fait après coloration par l'hématoxyline ferrique. On note tout d'abord d'importantes hémorragies intertissulaires et une forte congestion.

Les lésions cellulaires portent sur le protoplasme et sur les noyaux. Le protoplasme granuleux forme des amas irréguliers. Les noyaux ne présentent pas de pycnose, mais ils sont hypertrophiés au point de paraître le double de ceux des témoins.

Les reins sont également fortement touchés. Ils sont congestionnés. Les vaisseaux sont dilatés et quelquefois rompus. De nombreux tubes ont subi des altérations cellulaires, les cellules sont détruites et leurs débris sont épars dans la lumière des tubes.

B. — Lésions chez le poussin.

Le foie chez le Poussin est le principal organe touché. Les lésions y sont très caractéristiques. Dès l'ouverture de l'animal aussitôt après la mort, le foie qui, normalement, apparaît sans aucune marbrure ni tache est, au contraire, recouvert sur toute sa surface d'un énorme piqueté hémorragique rougeâtre et violacé, irrégulier, contrastant fortement avec le fond jaune clair qui apparaît par endroits. Lorsque la dose du poison est moins forte, le nombre de ces taches hémorragiques se réduit. On peut ne plus trouver que 3 à 4 petites marques brunes sur chaque lobe. Que la substance soit injectée ou ingérée, fraîche ou chauffée, on obtient toujours ce même piqueté caractéristique. (Fig. 1, p. 37).

L'examen microscopique décèle d'importantes hémorragies étalées en nappes et des capillaires dilatés, même souvent rompus. Les lésions cellulaires se bornent à une légère atrophie des cellules et des noyaux contrairement à ce qu'on a observé chez les grenouilles. On observe également de grandes plages de plusieurs groupes de

cellules nécrosées ayant l'aspect vide. Les noyaux, quand ils restent, semblent avoir été refoulés contre les parois des cellules.

Les lésions rénales par contre sont peu importantes. On observe une légère congestion, mais pas de destruction cellulaire. De nombreux leucocytes éosinophyles apparaissent dans les capillaires, alors qu'ils n'existent pas chez les témoins.

C. — Action hémolytique.

De nombreux auteurs ont signalé l'action hémolysante de l'extrait d'Amanita phalloïdes chez un grand nombre d'animaux. Tous n'étant pas également sensibles nous avons recherché si cette action s'exerce aussi sur le sang des grenouilles et des poussins. Nos expériences ont été faites avec l'extrait frais et l'extrait porté à ébullition.

Le sang a été prélevé sur des animaux neufs, et aussitôt défibriné. Les globules sont ensuite lavés dans du sérum physiologique et centrifugés plusieurs fois. On les émulsionne ensuite à raison de 5 % dans du sérum physiologique.

Sachant que le sang humain est hémolysé totalement par un centimètre cube d'extrait frais, nous l'avons utilisé comme témoin dans nos expériences.

Nous avons préparé d'une part une émulsion à 5 % de globules de sang humain et d'autre part une émulsion au même titre de globules de sang de grenouille et de sang de poussin. 1 cm^3 de chacune de ces émulsions a été mis en contact avec 1 cm^3 d'extrait frais d'Amanites phalloïdes. Après 10 minutes, on observe une hémolyse complète dans les tubes contenant le sang humain, une hémolyse partielle dans les tubes contenant les globules de poussin et aucune hémolyse dans ceux contenant les globules de grenouilles.

Ces expériences ont été refaites avec une émulsion de globules plus diluée, soit 2,5 %. Les mêmes résultats ont été obtenus.

L'examen microscopique des hématies montre après l'hémolyse, des globules déformés et déchiquetés dans le sang humain et dans le sang de poussin et intacts dans le sang de grenouille.

Les expériences ont été faites également avec l'extrait d'Amanite préalablement chauffé à l'ébullition. Les globules de sang humain, ceux de poussin et ceux de grenouille mis en contact avec cet extrait dans les mêmes conditions que précédemment ne présentent plus aucune trace d'hémolyse. Le pouvoir hémolytique a donc été détruit par la chaleur. L'hémolysine existe donc réellement dans le suc des champignons phalloïdiens mais son action est nulle dans les intoxications humaines lorsque celles-ci ont été causées par ingestion de champignons cuits.

Les expériences faites avec l'extrait chauffé montrent que les lésions du foie et du rein ont été déterminées en l'absence de l'hémolysine, par le poison phalloïdien thermostable. (Amanita-toxine de Ford, hépato-toxine de Limousin, Phalloïdine de Wieland).

Figure I.

Foie hémorragique de Poussin ayant reçu en injection sous-cutanée 2 mgr d'extrait purifié d'Amanites phalloïdes. Mort 24 heures après l'injection. Gr × 2,9.

F : *foie.* — *I* : *intestin.* — *P* : *pancréas.* — *C* : *cœur.*

Figure II.

Embryon de Poulet ayant reçu à 48 heures une dose de 0,001 mgr d'extrait purifié d'Amanites. Mort âgé de 4 jours, présentant une hémorragie caudale. Vue dorsale. Gr × 10,6.

H : *hémorragie.* — *C* : *bourgeon caudal.* — V_1 V_2 : *vaisseaux vitellins.* — M_1 : *membre supérieur.* — M_2 : *membre inférieur.*

Figure III.

Même embryon que figure 2. Vue ventrale. L'hémorragie H écarte les bords de la partie inférieure de la goutlière intestinale : I.

TROISIEME PARTIE

ACTION DU POISON PHALLOIDIEN AU COURS DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE

De nombreux auteurs ont injecté dans l'œuf de Poule des substances chimiques dans le but d'étudier leur action sur le développement. Ces injections ont surtout été faites dans la chambre à air ou l'albumen d'œufs non incubés ou au cours du premier jour de l'incubation. Les résultats obtenus ont montré que les substances utilisées quoique très différentes les unes des autres au point de vue chimique avaient toutes la même action sur le développement. C'est ainsi, par exemple, que Féré qui a injecté de l'acétone, des alcools méthylique, éthylique et propylique, du chloroforme, de la morphine, de la nicotine, du chlorhydrate de cocaïne, de la peptone, de l'acide cyanhydrique, du glucose, de la glycérine, de la malléïne, de l'atropine, de la strychnine, de la caféine, de la cantharidine, du chlorure de sodium, de l'iodure et du bromure de potassium, du bromure de strontium. des toxines microbiennes (tétanique, diphtérique, pyocyanique, tuberculeuse), des venins, etc..., a constaté que quelle que soit la substance injectée, le nombre des embryons malformés était toujours plus grand chez les embryons développés dans des œufs injectés que chez les témoins, mais

que les malformations obtenues étaient toujours les mêmes que chez les témoins. Toutes ces substances seraient donc tératogènes et leur constitution chimique serait sans importance pour la production des malformations embryonnaires. Les recherches faites au cours de ces dernières années par P. Ancel et Mme S. Lallemand sur des embryons de Poulet arrivés à la 48e heure de l'incubation ont au contraire montré que sur 80 substances expérimentées, un grand nombre ne sont pas tératogènes et que la nature de la substance utilisée joue un rôle important dans la production des malformations. Nos résultats obtenus dans les conditions expérimentales où ces auteurs se sont placés prennent toute leur valeur si on les compare aux leurs, aussi rapporterons-nous tout d'abord ceux qu'ils ont obtenus avec les toxines. Nous exposerons ensuite les résultats de nos expériences.

CHAPITRE Ier.

ACTION TÉRATOGÈNE DE TOXINES VÉGÉTALES ET ANIMALES

Ancel et Lallemand ont étudié comme phytotoxines la ricine et l'abrine et comme toxines animales, les toxines diphtérique et tétanique. Les phytotoxines ont donné toutes deux des strophosomes et des célosomiens. Les strophosomes sont des monstres qui n'ont jamais été signalés à l'état spontané chez le Poulet, on ne les connaît que chez les Bovidés. Une seule substance autre que les phytotoxines les a produits, c'est la colchicine. Les célosomiens sont des monstres qu'on observe spontanément dans une proportion inférieure à 1 p. 100, mais jamais sur des embryons qui, au stade de 48 heures, n'ont aucun retard de développement ni anomalie de la forme ; la célosomie peut donc être produite par les phytotoxines au même titre que la strophosomie. La ricine donne plus de monstres que l'abrine ; en ce qui concerne les strophosomes, elle les a fait apparaître dans une proportion de 38,4 % avec une dose de 0,0001 mg et l'abrine dans une proportion de 26 % avec une dose de 0,002 mg. L'action tératogène de la ricine sur l'embryon de Poulet a été confirmée par Youssef. Les toxines tétanique et diphtérique n'ont au contraire pas déterminé la formation de monstres dans ces mêmes conditions expérimentales. Cependant avec la toxine diphtérique, il a été très souvent

observé des déformations du corps apparaissant très précocement, dans les 24 heures qui suivent l'injection ; ces déformations consistent en une lordose dont la partie saillante se trouve immédiatement au-dessous du cœur (lordose sous-cardiaque). Cette lordose précoce se réalise aussi d'une façon constante chez les futurs monstres strophosomes et presque toujours aussi chez les futurs montres célosomiens ; on l'observe constamment dans ces conditions après action de la ricine et de l'abrine de même qu'après action de la colchicine, on l'observe aussi chez les futurs célosomiens produits par la trypaflavine, la saponine, la tochlorine et le cacodylate de sodium. La toxine diphtérique aux doses de 1 p. 2.000 et au-dessous n'a pas fait apparaître d'embryons lordosiques. La dose de 1 p. 1000 en a donné une proportion de 22 %, la dose de 1 p. 500 66 % et la dose de 1 p. 100 100 %. Tous ces embryons lordosiques sont morts trop précocement pour qu'il soit possible de savoir s'ils auraient donné naissance à des embryons monstrueux.

De l'ensemble de leurs recherches, P. Ancel et Mme Lallemand tirent les conclusions suivantes : La nature de l'agent tératogène a une grande importance dans la réalisation des monstruosités contrairement aux conclusions des auteurs qui ont expérimenté sur l'œuf de Poule avant l'incubation ou dans les premières 24 heures. A ce stade de 48 heures, la circulation est complètement établie et le cœur bat depuis longtemps ; il n'est cependant pas innervé, le pneumogastrique et le sympathique ne l'atteignent pas avant la 68e heure pour le premier et la 84e pour le second. Les résultats obtenus suggèrent qu'il existe pour chaque substance toxique un gradient de sensibilité pour les différentes régions embryonnaires. Toutes les malformations obtenues sont dues en effet à un arrêt de développement localisé à une petite région de l'embryon. Cette région hypersensible varie avec les toxiques. Quand cette région est une région dont l'intégrité est indispensable à la vie, le toxique tue mais n'est pas tératogène. Les destructions localisées faites à l'aide des rayons X sur des embryons à divers stades du développement par E. Wolff ont montré que le cœur ou le sang sont les seuls organes ou tissus indispensables à la

vie et qu'en particulier la destruction du système nerveux central n'entraîne pas la mort. L'hypersensibilité du cœur ou du sang pour une substance toxique l'empêchera donc d'être tératogène. Quand au contraire, une ou plusieurs régions embryonnaires seront plus sensibles que le cœur ou le sang pour une substance donnée, cette substance pourra produire une ou plusieurs malformations. La différence dans les résultats obtenus entre les phytotoxines et les toxines animales serait donc due à ce que le cœur ou le sang sont électivement plus sensibles à ces toxines animales qu'à la ricine et à l'abrine et comme les monstres obtenus avec l'abrine meurent plus précocement que ceux obtenus avec la ricine, on pourrait établir à ce sujet un classement des quatre substances par hypersensibilité croissante du cœur et du sang ; ricine, abrine qui donnent des strophosomes, toxine diphtérique qui donne des lordoses sous-cardiaques fréquentes suivies de mort rapide et enfin toxine tétanique qui tue en ne donnant que plus rarement des embryons lordosiques.

CHAPITRE II.

RECHERCHES PERSONNELLES SUR L'EMBRYON DE POULET

A. — Technique.

Notre étude a été faite sur des œufs de Poule mis en incubation pendant 48 heures dans une couveuse électrique réglée à 37°5. A ce moment, une fenêtre est pratiquée dans la coquille et on dépose une goutte de solution toxique sur les embryons qui ne présentent aucun retard de développement ni aucune anomalie de la forme, puis la fenêtre est fermée par une petite lame de verre lutée à la paraffine et on les remet à la couveuse. Chaque expérience a porté sur un nombre d'œufs variant de 8 à 15. Le compte-gouttes utilisé donnait 20 gouttes au centimètre cube. Comme la célosomie, malformation produite par l'abrine et la ricine ne peut être diagnostiquée avec certitude qu'à partir du début du 6e jour de l'incubation, nous avons pris comme dose toxique celle qui tue tous les embryons avant cette date. Cette dose toxique si elle ne permet pas de reconnaître la célosomie, peut cependant mettre en évidence les arrêts de développement d'autres régions qui provoquent la formation de l'anourie ou de l'atrophie du bourgeon caudal, de l'ectromélie, de l'hémimélie, de la symélie, de la strophosomie, de l'ectrosomie, etc..., malformations déterminées dans ces mêmes conditions par certaines substances chimiques.

L'extrait d'amanite a été utilisé frais ou après chauffage ou après purification chimique. Les dilutions ont été faites avec de l'eau distillée. Le dépôt de cet extrait sur l'embryon a été fait à divers stades. Pour pouvoir établir une comparaison entre nos résultats et ceux obtenus avec d'autres toxines végétales et animales, nous avons opéré au stade de 48 heures en vue de la recherche du pouvoir tératogène des extraits. Les expériences faites à des stades plus avancés alors que la majeure partie des grandes malformations embryonnaires ne peut plus être obtenue par aucun agent tératogène, l'ont été en vue d'étudier la toxicité de l'extrait et les lésions produites pour comparer entre eux les résultats obtenus avant et après l'éclosion. Nous rapporterons successivement les expériences faites à ces deux points de vue.

B. — Recherches de la puissance toxique et du pouvoir tératogène au stade de 48 heures.

Nous rapporterons successivement les résultats obtenus avec l'extrait frais, l'extrait chauffé et l'extrait purifié.

a) *Extrait frais.*

Une goutte d'extrait frais renfermant 2,4 mg de substance sèche a tout d'abord été déposée sur les embryons. Ils ont tous réagi de la même manière. Le rythme cardiaque s'est ralenti progressivement et le cœur s'est arrêté en diastole 20 à 30 minutes après l'injection. Des dilutions de cet extrait ont été faites avec de l'eau distillée. La dose toxique qui tue tous les embryons avant le début du 6e jour a été obtenue sur 20 œufs avec la dose de 0,004 mgr. Presque tous ces embryons présentaient une lordose sous-cardiaque très nette, mais aucune autre malformation. Avec la dose de 0,0021 mg, les quatre cinquièmes seulement des embryons sont morts avant le début du 6e jour et un tiers d'entre eux étaient lordosiques. Avec la dose de 0,0012 mg, la moitié des embryons a succombé avant le début du 6e jour, quelques-uns seulement des embryons étaient lordosiques. Les embryons qui ont dépassé le 6e jour sont morts en majorité autour du 12e jour, mais certains d'entre eux ont atteint la fin de la période d'incubation. Parmi les embryons qui ont suc-

combé au voisinage du 12e jour, certains ont présenté des malformations du bec. Ces malformations portaient soit sur le demi-bec supérieur soit sur le demi-bec inférieur. La malformation du demi-bec supérieur est caractérisée par une déviation latérale due à un développement inégal des deux moitiés de la face, le demi-bec se déviant du côté le moins développé (bec asymétrique). La malformation du demi-bec inférieur consiste en un développement inférieur à la normale. L'extrémité de ce demi-bec n'atteint pas celle du demi-bec supérieur (brachygnathie inférieure) dans certains cas, le cartilage qui limite le demi-bec à sa périphérie est coudé à angle droit sur ses deux parties latérales dans une région voisine du crâne (déformation angulaire). Cette déformation peut être plus accentuée d'un côté que de l'autre, ce qui peut entraîner une légère déviation du demi-bec. Les malformations des deux demi-becs peuvent coexister.

b) *Extrait chauffé.*

La chaleur a diminué la toxicité de l'extrait. La dose toxique s'est élevée à 0,022 mg au lieu de 0,004. Parmi les embryons tués avec cette dose les neuf dixièmes présentaient une lordose sous-cardiaque. La plus petite dose qui n'a tué aucun embryon avant le 6e jour est celle de 0,0022 ; elle n'a déterminé l'apparition d'aucune lordose et 25 % des embryons ont atteint la fin de la période d'incubation, tandis qu'avec la même dose d'extrait frais, les quatre cinquièmes des embryons étaient morts avant le 6e jour et qu'un tiers d'entre eux étaient lordosiques.

c) *Extrait purifié.*

L'extrait purifié a donné au point de vue tératogénique les mêmes résultats que l'extrait frais ou l'extrait chauffé. La dose qui a tué tous les embryons avant le début du 6e jour (dose toxique 0,004) a provoqué l'apparition d'embryons lordosiques qui sont morts dans les 48 heures qui ont suivi l'injection et les doses plus faibles qui ont permis à certains embryons d'atteindre la fin de l'incubation n'ont donné aucune malformation, sauf celles du bec décrites après action de l'extrait frais, observées ici encore chez des embryons morts au voisinage du 12e jour.

Nous avons aussi observé avec l'extrait purifié un cas d'hémorragie caudale intraembryonnaire absolument semblable à ceux qui ont été décrits par P. Ancel et Mme Lallemand après action du sulfate neutre de strychnine, du sulfate de brucine, du sulfate de quinine et du bleu trypan (fig. 2 et 3). L'embryon porteur de l'hémorragie que nous avons observé à la 72e heure de l'incubation est mort au début du 4e jour ; l'hémorragie siégeait à l'extrémité caudale au niveau du bourgeon caudal, elle était très volumineuse et faisait hernie par la partie inférieure de la gouttière intestinale qu'elle refoulait ventralement. La topographie de ces hémorragies caudales intra-embryonnaires a été étudiée par Stoll qui a observé qu'elles sont dues à une rupture de la partie terminale de l'une ou des deux aortes, donnant ainsi des hémorragies uni ou bilatérales, ces dernières pouvant ultérieurement se réunir en une grande hémorragie médiane comme dans notre cas. Les coupes sagittales que nous avons faites montrent que le sang s'est accumulé entre le tube nerveux et la chorde dorsale ; le tube nerveux apparaît écrasé contre l'ectoderme tandis que la chorde est refoulée avec l'endoderme dans la gouttière intestinale.

Les hémorragies caudales intraembryonnaires peuvent évoluer de trois façons différentes. Apparues dans les 24 premières heures qui suivent l'injection elles peuvent disparaître dans les 24 heures qui suivent leur apparition et l'embryon se développe normalement ou bien elle ne disparaissent pas et l'embryon meurt au troisième jour de l'incubation ou enfin l'hémorragie persiste pendant plusieurs jours, elle entrave le développement dans la région où elle s'est produite et elle détermine soit l'atrophie du bourgeon caudal soit des malformations des membres inférieurs soit même de la célosomie, toutes malformations qui peuvent ne pas empêcher l'embryon d'atteindre la fin de la période d'incubation. Dans notre cas l'embryon mort très précocement ne présentait aucune malformation.

C. — Action du poison phalloidien chez les embryons âgés de plus de 48 heures.

Les expériences ont été faites avec de l'extrait d'ama-

nites préalablement chauffé dans les conditions décrites antérieurement. Les injections ont été faites à des embryons âgés de 7, 12, 14, 16, 18 et 19 jours.

Les œufs devant servir aux expériences sont mis dans la couveuse à la température de 37°5 et ouverts après 48 heures d'incubation. Les embryons en retard ou de forme anormale sont éliminés ; les autres après fermeture de la fenêtre ouverte dans la coquille à l'aide d'une lame de verre sont remis à la couveuse.

Une dose suffisante pour amener la mort de tous les embryons de 7 à 12 jours en 24 heures a déterminé de fortes hémorragies ; le foie présente un piqueté de tâches noirâtres, l'épiderme est tacheté de plaques violacées, les mésonéphros sont très fortement congestionnés. Le tube digestif a au contraire un aspect normal. La même dose a amené en 72 heures la mort de tous les embryons lorsqu'elle a été déposée sur ceux qui avaient atteint le 14e, le 16e et le 18e jour de l'incubation. Le foie et le mésonéphros sont les seuls organes qui paraissent avoir réagi, le foie est parsemé de tâches brunâtres et les mésonéphros sont très fortement congestionnés. Les embryons injectés à 19 jours ont montré les mêmes lesions mais ils sont morts plus rapidement après avoir reçu la même dose.

L'examen microscopique du foie et des reins a montré les mêmes lésions que celles qui avaient été observées sur les poussins, hémorragies et lésions cellulaires. Il y a cependant certains embryons qui sont morts sans présenter aucune lésion nette des reins et du foie et sans hémorragies.

D. — Interpretation des resultats obtenus sur l'embryon.

Les résultats que nous ont donné les injections faites à la quarante-huitième heure de l'incubation montrent que l'extrait d'amanite présente une très forte toxicité pour l'embryon et que cette toxicité est plus élevée pour l'extrait frais que pour l'extrait chauffé. Au point de vue de la tératogénèse le poison phalloïdien a donné des lordoses précoces, des malformations du bec et une hémorragie caudale intraembryonnaire.

Les embryons lordosiques peuvent être observés à l'état spontané mais dans de très faibles proportions et plus fréquemment d'après les recherches de P. Ancel et de Mme Lallemand avec diverses substances comme des arsenicaux et des sulfamides, mais les substances qui en ont provoqué l'apparition dans des proportions supérieures à 50 % ne sont pas très nombreuses. Sur les 80 qu'ils ont expérimentées on ne trouve que l'abrine, la ricine et la colchicine qui donnent des strophosomes, puis la toxine diphtérique, l'aniline, la saponine et la trypaflavine. Le poison phalloïdien vient se placer à côté de ces substances puisque dans certaines expériences il nous a donné 90 % d'embryons lordosiques.

Les malformations du bec que nous avons signalées peuvent être observées après action d'un très grand nombre de substances. Ces auteurs ne les ont rencontrées que chez des embryons morts autour du 12e jour et jamais après le 15e jour. Nos résultats sont, à ce sujet, tout-à-fait d'accord avec les leurs. Ces malformations du bec apparaissent ainsi liées à une gène du développement portant sur l'embryon tout entier et se manifestant plus spécialement sur une région qui, à cette époque, est en voie particulièrement active de réalisation. Ces mêmes malformations peuvent en effet être obtenues par incubation d'œufs à des températures élevées (40°5).

Les hémorragies caudales intraembryonnaires dont nous avons observé un cas peuvent être produites par plusieurs substances, celles qui les ont fait apparaître le plus fréquemment sont le bleu trypan, la strychnine et la quinine. Avec ces trois substances, les hémorragies ont déterminé des malformations du bourgeon caudal et des membres inférieurs.

Parmi toutes les autres malformations que certaines substances chimiques peuvent faire apparaître lorsqu'on les dépose sur l'embryon au stade de 48 heures, aucune n'a été déterminée par le poison phalloïdien. L'action tératogène de ce poison apparaît donc peu importante puisque les malformations du bec constatées, dont de nombreuses substances chimiques peuvent provoquer l'apparition sont des malformations banales et que l'hémorragie caudale observée ne s'est pas montrée tératogène.

Restent les embryons lordosiques ; les substances qui les déterminent ne méritent pas à proprement parler d'être appelées tératogènes parce que ces lordoses ne sont qu'une modification temporaire de la forme du corps qui est suivie ou non de malformations. On peut en effet voir disparaître la lordose et l'embryon lordosique devenir tout-à-fait normal ou bien la lordose s'étend à tout le corps et l'embryon devient strophosome ou bien la célosomie s'installe et sur les embryons qui atteignent la deuxième moitié de l'incubation la lordose a disparu.

Les résultats que nous ont donnés nos expériences entreprises avec le poison phalloïdien montrent qu'on ne peut reconnaître dans l'embryon au stade de 48 heures l'existence d'une région qui soit particulièrement sensible à ce poison et dont la lésion soit cause de malformation par arrêt de développement localisé, alors qu'à ce stade il existe au contraire une ou plusieurs régions hypersensibles pour diverses substances chimiques. Si cette région hypersensible existe dans le cas du poison phalloïdien, elle est masquée par la sensibilité plus grande encore du cœur et du sang qui est cause de la mort à une dose trop faible pour que le développement puisse mettre en évidence la sensibilité de cette région. L'obtention des embryons lordosiques donne cependant à penser que la région dont la lésion provoque les lordoses est particulièrement sensible au poison, mais moins que le cœur ou le sang. Ce résultat permet de rapprocher l'action du poison phalloïdien de celle des autres toxines végétales et animales. Les deux toxines végétales et les deux toxines animales étudiées au point de vue tératogénique par P. Ancel et S. Lallemand ont en effet provoqué l'apparition d'embryons lordosiques mais tandis que les phytotoxines déterminent la formation de monstres strophosomes ou célosomiens, les embryons lordosiques obtenus avec les toxines animales succombaient dans les 48 heures qui suivaient l'injection. Le poison phalloïdien s'est donc comporté dans nos expériences comme les toxines animales. Ce fait est probablement dû à ce que le système circulatoire est plus électivement sensible au poison phalloïdien qu'à l'abrine et à la ricine. Cette sensibilité de l'appareil circulatoire est mise en évidence par

l'arrêt du cœur avant toute innervation par une très faible dose d'extrait frais et par l'action hémolytique de cet extrait chez l'embryon de Poulet. La destruction de l'hémolysine par chauffage n'abolit pas l'action de l'extrait phalloïdien sur l'appareil circulatoire puisque les arrêts rapides du cœur au stade de 48 heures ont été obtenus avec cet extrait chauffé comme avec l'extrait frais et l'hémorragie caudale intraembryonnaire avec l'extrait chauffé et purifié.

Chez les embryons depuis le 7e jusqu'au dernier jour de l'incubation, la réaction de l'appareil circulatoire paraît aussi être la principale, elle se manifeste par des congestions internes et des hémorragies du foie, des reins et même de la peau.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

L'amanite phalloïde et l'amanite printanière ou verna renferment des poisons qui seraient au nombre de quatre suivant les auteurs qui ont poussé le plus avant l'étude chimique de l'extrait d'amanite obtenu par extraction à la presse. L'un d'eux est thermolabile et hémolytique (hémolysine). Les trois autres, d'après Lynen et Wieland, peuvent être séparés les uns des autres grâce à leur solubilité différente, les deux premiers la toxine amanite et la phalloïdine ont été préparés à l'état pur, mais pas le poison III. L'ensemble de ces trois poisons qui sont les facteurs de l'intoxication phalloïdienne constitue le poison phalloïdien ou amanitine (Letellier) ou phalloïdine (Ore) ou amanita-toxine (Ford).

Nous avons expérimenté l'extrait d'amanite sur la Grenouille, le Poussin et l'embryon de Poulet.

L'extrait frais très hémolytique sur le sang humain s'est aussi montré hémolytique mais moins fortement pour le Poussin et pas du tout pour la Grenouille.

Le chauffage de cet extrait qui détruit l'hémolysine a diminué sa toxicité. Le poison phalloïdien thermostable présent dans les extraits chauffés s'est montré plus toxique pour le Poussin que pour la Grenouille et plus toxique en injection qu'en ingestion.

Les symptômes de l'intoxication phalloïdienne se présentent avec les mêmes caractères chez la Grenouille et le Poussin. Les principaux sont : l'asthénie, la somnolence, l'accélération, puis le ralentissement de la respiration avec dyspnée et enfin la mort.

Les lésions organiques les plus caractéristiques ont été celles du foie ; cet organe étant si fortement congestionné

qu'il apparaît macroscopiquement entièrement recouvert d'un important piqueté hémorragique. Les lésions cellulaires intéressent particulièrement le protoplasme qui a l'aspect coagulé et rappelle la dégénérescence granuleuse ; il présente également des plages de nécrose où seuls les noyaux restent accolés aux membranes.

L'action du poison phalloïdien a été expérimentée sur l'embryon de Poulet à divers stades du développement depuis la quarante-huitième heure de l'incubation jusqu'au 19e jour inclusivement. A 48 heures, on a utilisé l'extrait frais, l'extrait chauffé et l'extrait purifié. Les fortes doses arrêtent le cœur en diastole en moins de 30 minutes. Pour l'extrait frais, la dose toxique qui tue tous les embryons avant le début du 6e jour a été de 0,004 mgr, l'extrait chauffé s'est montré moins toxique ainsi que l'extrait purifié.

Le développement des embryons a présenté certaines anomalies qui ont été les mêmes avec les trois variétés d'extraits. On a observé des lordoses précoces, des malformations du bec et une hémorragie caudale intra-embryonnaire.

Comparée à l'action tératogène d'autres substances chimiques, celle du poison phalloïdien n'a pas présenté de spécificité.

Les résultats obtenus avec d'autres toxines ont montré qu'au point de vue tératogénique le poison phalloïdien a comme caractère commun avec ses autres toxines de provoquer l'apparition de nombreux embryons lordosiques dans les 24 heures qui suivent l'injection, mais il se rapproche plus des toxines animales étudiées, la toxine diphtérique et la toxine tétanique que des phytotoxines l'abrine et la ricine ; ces phytotoxines déterminent en effet l'apparition de monstres strophosomes et célosomiens contrairement aux toxines animales et au poison phalloïdien et ce caractère est d'importance, puisque sur 80 substances étudiées, les monstres strophosomes n'ont été obtenus qu'avec la colchicine, l'abrine et la ricine.

Les embryons âgés de 7 à 19 jours ont montré pour le poison phalloïdien, la même action physio-pathologique et les mêmes lésions que les poussins et les gre-

nouilles en particulier sur le foie et le rein. Le système circulatoire embryonnaire réagit fortement à l'action de ce poison dès qu'il est constitué et même avant son innervation. La sensibilité du système circulatoire pour le poison phalloïdien paraît être la cause qui amène la mort précoce des embryons lordosiques et empêche la réalisation de monstres strophosomes ou célosomiens.

AUTEURS CITÉS

ABEL et FORD. — On the poisons of Amanita phalloïdes. *The Journal of Biological Chemistry*, New-York City, vol II, p. 273, 1906.

ANCEL P. et LALLEMAND (Mme S.). — Action de divers alcaloïdes sur le développement de l'embryon de Poulet. Arch. Phys. Biol. T. 15, n° 42, 1941.

— Sur l'action tératogène de certaines toxines végétales et animales. Arch. Phys. Biol. T. 15, n° 49, 1941.

— Sur l'action tératogène de substances chimiques chez l'embryon de Poulet. C. R. Acad. Sc. T. 212, p. 313, 1941.

— Sur l'obtention de la strophosomie à l'aide de la ricine. C. R. Acad. Sc. T. 212, p. 312, 1941.

— Sur l'action tératogène des hautes températures d'incubation chez l'embryon de Poulet. C. R. Soc. Biol. T. 135, p. 221, 1941.

— Sur le pouvoir tératogène des hémorragies déterminées par des substances chimiques chez l'embryon de Poulet. Arch. Phys. Biol. T .16, n° 59, 1942.

AWAD. — Recherches sur l'action tératogène de substances à noyau Phénanthrène. Thèse de Pharmacie. Strasbourg, 1940.

BEAUVILLAIN et BOILOT. — Action toxique et hypoglycémiante du poison phalloïdien. C. R. Soc. Biol. T. 136, p. 396, 1942.

BINET ET MAREK. — Hypoglycémie au cours de l'intoxication par les Champignons. C. R. Acad. Sc. T. 202, p. 1219, 1936.

— Contribution expérimentale à la thérapeutique de l'intoxication par les Champignons. C. R. Acad. de Méd. T. 115, p. 450, 1936.

BINET et WELLER. — Pouvoir antitoxique du glutathion sur le venin de Cobra. C. R. Acad. Sc. T. 204, p. 1513, 1937.

Boudier. — Observations sur quelques Amanites. *Bull. Soc. Mycol.* T. 18, p. 258, 1902.

Braconnot. — Recherches analytiques sur la nature des Champignons. *Ann. de Chimie.* T. 79, p. 265, 1811.

Bulliard. — Histoire des Champignons de France. Paris 1791-98.

Carmichael. — Influence of chemical and other aspects upon toxicity and antigénic power of ricin. *J. Pharmacol. and Exper. Thérap.* T. 35, p. 193, 1929.

Chauvin. — Sur la toxicité d'Amanita Verna. *Bull. de la Soc. Mycol. de France.* T. 41, p. 89, 1925.

Cordier. — Essais sur la toxicité de quelques Champignons avant et après dessication. Thèse de médecine, Lyon, 1898.

Déquéant. — Traitement des empoisonnements par les champignons vénéneux. Thèse de médecine, Paris 1934.

Dujarric de la Rivière. — Le poison des Amanites mortelles. Masson, Paris 1933.

Fagault. — Recherches chimiques et expérimentales sur l'empoisonnement par les Champignons. Thèse de médecine, Paris 1903.

Faller. — Essais d'utilisation du sel de Reinecke pour la recherche et le dosage des bases organiques en toxicologie. Thèse de pharmacie, Strasbourg, 1939.

Féré. — Nombreuses notes publiées dans les C. R. de la Soc. de Biol. de 1893 à 1901.

Ferry. — La Phalline. Traduction dans la *Revue Mycol.* T. 19, p. 121, 1897.

Ford. — The pathology of A. phalloïdes intoxication. *J. of Infections diseases.* Chicago, p. 116, 1908.

Fries. — Observationes mycologicae 1815 et 1828.

Gillot. — Etude médicale sur l'empoisonnement par les Champignons. Thèse de médecine. Lyon 1900.

Guétrot et Meitès. — Résultats des expériences concernant l'empoisonnement phalloïdien. C. R. Acad. de méd. T. 119, p. 612, 1938.

Guillaume. — Nouvelles recherches sur le traitement des intoxications par les Champignons vénéneux. Thèse de pharmacie, Toulouse 1941.

Haffringue. — Recherches expérimentales sur les principes toxiques contenus dans les Champignons. Thèse de médecine, Paris 1914.

Henry. — Considérations anciennes et nouvelles sur les intoxications fongiques. Thèse de médecine, Lyon, 1931.

Kobert. — La Phalline. *Revue mycologique* nº 76, p. 121, 1897.

LALLEMAND (Mme S.). — Réalisation à l'aide de la colchicine, de Poulets strophosomes. C. R. Acad. Sc. T. 207, p. 1446, 1938.

— Action de la colchicine sur l'embryon de Poulet à divers stades du développement. C. R. Acad. Sc. T. 208 p. 1048, 1939.

LEDEBT. — Contribution à l'étude des propriétés biologiques des venins. Thèse de sciences, Paris 1913.

LEROY. — L'intoxication fongique, ses causes, ses effets, son traitement. Thèse de médecine, Paris, 1912.

LETELLIER. — Recherches sur les principes toxiques des Champignons. *Ann. d'Hygiène publique et de médecine légale* T. 27, p. 71, 1867.

LI-KOUE-TCHANG. — Recherches histologiques sur la structure du rein des Oiseaux. Thèse de sciences, Lyon 1923.

LIMOUSIN. — Le traitement des intoxications par les Champignons vénéneux. Science Médicale pratique, Paris 1933.

LYNEN et WIELAND. — Uber die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes. *Ann. der Chemie,* T. 533, p. 171, 1938.

MACHEBŒUF. — Les phytotoxines. *Bull. Sc. pharmac.* T. 36, p. 245, 1929.

ORE. — De l'influence de l'empoisonnement par l'Agaric bulbeux sur la glycémie. Ac. des Sc. T. 83, p. 837, 1876.

PERSOON. — Traité sur les Champignons comestibles. Paris, 1818.

PHISALIX. — La cholestérine et les sels biliaires, vaccins chimiques du venin de Vipère. C. R. Acad. des Sc. T. 125, p. 1053, 1897.

PITTINARI. — Action toxique des Amanites phalloïdes. C. R. Acad. Sc. T. 180, p. 163, 1925.

RADAIS et SARTORY. — Immunisation du Lapin contre les poisons des Amanites à phalline. C. R. Acad. Sc. T. 151, p. 156, 1910.

REHNS. — Essais sur les toxalbumines végétales. C. R. Soc. Biol. T. 54, p. 212, 1902.

SARTORY et MAIRE. — Les champignons vénéneux. Lefrançois, Paris 1914.

SEIBERT. — Beitrage sur Toxicologie der A. phalloïdes : Thèse Wurzbourg, 1893.

SELLYE. — Effets toxiques des hormones sexuelles. C. R. des Conférences du Collège de France. Paris, Hermann, 1938.

SOLOMIDÈS. — Recherches sur l'action toxique de la glycérine sur le Rat. C. R. Soc. Biol. T. 131, p. 359, 1939.

Stoll R. — Recherches sur le rôle de l'hypophyse et de la thyroïde embryonnaires dans le développement de l'embryon de Poulet. Thèse de médecine, Strasbourg, 1939.

— Sur une hémorragie caudale tératogène obtenue expérimentalement chez l'embryon de Poulet. Arch. Phys. Biol. T. 15, n° 42, 1940-41.

Vaillant. — Botanicon parisiense 1723.

Villedieu. — Contribution expérimentale à l'étude physiologique des saponines. Thèse de Pharmacie, Toulouse 1939.

Vogt. — Pharmakologische Untersuchung des kristallisierten Giftes « Phalloïdin » des Knollenblätterschwam. Arch. f. exp. Path. u. Pharmakol. T. 190, p. 406, 1938.

Wieland et Witkop. — Uber die Giftstoffe des Knollenblätterpilzes. Ann. der Chemie, t. 543, 1940.

Wolff. — Les bases de la tératogénèse expérimentale des Vertébrés amniotes d'après les résultats des méthodes directes. Thèse doctorat sciences Strasbourg, 1936.

Youssef. — Contribution à l'étude de la colchicine et de la ricine. Thèse pharmacie Strasbourg 1941.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 7

PREMIÈRE PARTIE : *Historique* 9

A. Botanique 9

B. Chimie 10

C. Toxicologie 14

D. Thérapeutique 19

a. Organothérapie 19

b. Sérothérapie 19

c. Autres procédés 19

DEUXIÈME PARTIE : *Recherches personnelles sur la toxicité du poison phalloïdien chez des animaux homéothermes et poïkilothermes* 21

CHAPITRE I. — Les différentes techniques de préparation des extraits 22

A. Techniques de préparation du poison 22

B. Techniques d'administration du poison aux animaux. 24

CHAPITRE II. — Symptômes et évolution de l'intoxication phalloïdienne 25

A. Symptômes chez la Grenouille 25

a. Injection d'extrait frais 25

b. Injection d'extrait chauffé 26

c. Injection d'extrait glycériné 26
d. Ingestion d'extrait frais 29
e. Ingestion d'extrait chauffé 30

B. Symptômes chez le Poussin 30

a. Injection d'extrait frais 30
b. Injection d'extrait chauffé 31
c. Injection d'extrait purifié 31
d. Ingestion d'extrait frais 31
e. Ingestion d'extrait chauffé 31

C. Toxicité comparée du poison phalloïdien chez la Grenouille et le Poussin 32

Chapitre III. — Les lésions déterminées par le poison phalloïdien 33

A. Lésions chez la Grenouille 33

B. Lésions chez le Poussin 34

C. Action hémolytique 35

Troisième partie : *Action du poison phalloïdien au cours du développement embryonnaire* 37

Chapitre I. — Action tératogène des toxines végétales et animales 39

Chapitre II. — Recherches personnelles sur l'embryon de Poulet 42

A. Techniques 42

B. Recherches de la puissance toxique et du pouvoir tératogène au stade de 48 heures 43

a. Extrait frais 43
b. Extrait chauffé 44
c. Extrait purifié 44

C. Action du poison phalloïdien chez des embryons âgés de plus de 48 heures 45

D. Interprétation des résultats 46

Résumé et conclusions 50

Vu : Clermont, le 22 juin 1943.

Le Président du Jury :

A. GUILLAUME.

Vu et approuvé :

Clermont, le 21 juin 1943.

Pour le Doyen :

L'assesseur :

J. VOLMAR.

Pour le Recteur :

Clermont, le 22 juin 1943.

A. DANJON.